

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550197

研究課題名(和文) 過酸化水素バイオイメージングのための高速・高感度過酸化水素蛍光プローブの開発

研究課題名(英文) Development of Rapid and Sensitive Fluorescent Probes for Hydrogen Peroxide Bio-imaging

研究代表者

人見 穰 (HITOMI, Yutaka)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：20335186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：鉄錯体を過酸化水素との反応点として有する蛍光プローブを複数開発した。これらの過酸化水素蛍光プローブは無蛍光であるが、細胞内で微量の過酸化水素と反応し、秒スケールで赤色や緑色蛍光物質(レゾルフィンやフルオレセイン)を生成する。これらの蛍光プローブの一つを用いて、上皮細胞成長因子の刺激によってA431細胞が情報伝達物質として生産する過酸化水素のリアルタイムイメージングに成功した。

研究成果の概要(英文)：A series of fluorescent probes for hydrogen peroxide have been developed that have a mononuclear nonheme iron complex as a reaction site toward hydrogen peroxide. They are all non-fluorescent, but once reacting with low concentrations of hydrogen peroxide inside cells, they release green- or red-emitting fluorescent dyes such as resorufin and fluorescein. We have succeeded in real-time imaging of hydrogen peroxide that was produced as a messenger inside A431 cells upon stimulation of epidermal growth factors.

研究分野：生体関連化学

キーワード：イメージング 蛍光 過酸化水素 検出 細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 過酸化水素は生体に障害を与える活性酸素の一つとして認識されてきた。しかし、近年、過酸化水素が細胞の成長、分化、移動を促す情報伝達物質として生産されることが明らかとなり注目を集めている (Rhee, Science 2006)。ペルオキシレドキシニン等の過酸化水素を消去する酵素が存在するにも関わらず、過酸化水素がどのようにして情報伝達物質として働くことができるのか明らかにされていなかったが、Wooらは、過酸化水素を生産する膜蛋白質 NADPH oxidase の近傍では、ペルオキシレドキシニン I をはじめとする過酸化水素を消去する酵素群が不活性化されることを示し、細胞膜直下の特定の場所で局所的に過酸化水素濃度が上昇するモデルを提案している (Woo et al. Cell 2010)。

(2) カルシウム蛍光プローブがカルシウムイオンの情報伝達物質としての働きを詳細に解き明かし、神経細胞を扱う研究者の必携の研究ツールとなったように、過酸化水素の細胞内の生産の場とタイミングを解き明かす過酸化水素蛍光プローブは過酸化水素の情報伝達物質として役割の解明に大きく貢献すると期待できる。しかし、既存の過酸化水素蛍光プローブでは、過酸化水素との反応は分オーダーであるため (半減期  $t_{1/2} = \text{ca. } 25 \text{ min}$ ) 過酸化水素の局所的な蛍光強度の向上を観測できず、蛍光プローブの拡散のために細胞全体が蛍光を放つ画像しか取得できていない (Chang et al. JACS 2004)。高速・高感度な過酸化水素蛍光プローブを開発することで、細胞内で酵素反応により生産される過酸化水素の生成をリアルタイムに可視化できると期待された。

(3) 金属錯体を過酸化水素との反応点とする高速・高感度な過酸化水素蛍光プローブ MBFh1 (MBFh = Metal-based fluorescent probe for  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) を合成している。MBFh1 は過酸化水素との反応によって赤色蛍光物質レゾルフィン放出する。応答速度は既存の過酸化水素蛍光プローブよりも約 1000 倍速く、酵素 (glucose oxidase) が生産する過酸化水素の濃度上昇の追跡が可能である (図 1、特許申請 : 特願 2010-183083 および PCT/JP2011/068360, *Analytical Chemistry*, 2011, 83(24), pp 9213-9216.)。しかし、MBFh1 は細胞培養液中における安定性が低く、細胞内の過酸化水素の蛍光イメージングには適用できなかった。

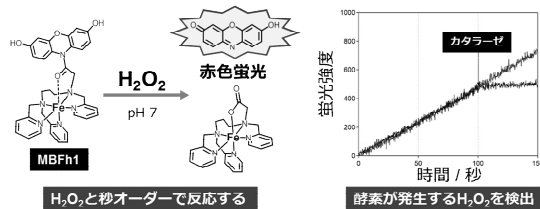


図 1 MBFh1 を用いた過酸化水素蛍光検出

2. 研究の目的

本研究では、MBFh1 の細胞培養条件下では不安定であるという問題を解決できる新たな金属錯体型蛍光プローブを開発し、これを用いて、成長因子等による刺激によって細胞が産生する微量の過酸化水素をライブイメージングすることを目的とした。

3. 研究の方法

MBFh1 を用いて細胞内外の過酸化水素の検出を試みた。その結果、MBFh1 は細胞培養条件において、MBFh1 のアミド部位が自発的な加水分解を受け、過酸化水素非存在下においても赤色蛍光を与えることが判明した。

水中において様々な鉄錯体と過酸化水素との反応をスクリーニングし、水中でペルオキシダーゼ活性を示す鉄錯体を見出し (Dalton Trans. 2013)、この錯体をもとに、アミド結合を持たず、水中での安定性、過酸化水素特異性および反応速度を向上させた MBFh2 を開発した (Chem. Commun. 2013)、また、レゾルフィンではなく、フルオレセインを放出する MBFh3 の開発も行った (Bull. Chem. Soc. Jpn. 2014)。

MBFh2 と過酸化水素との反応は蛍光分光装置を用いて評価した。過酸化水素だけではなく、他の活性酸素種との反応も評価した結果、極めて過酸化水素特異的なプローブであることが判明した。また、過酸化水素との反応により生成する蛍光物質および錯体は、高速液体クロマトグラフィーおよびイオンスプレー質量分析装置によって評価した。

4. 研究成果

MBFh2 は MBFh1 と同様、秒単位で過酸化水素と反応し、赤色蛍光を与えること、また、細胞培養条件においても十分に安定であることを確認した。HeLa 細胞、A431 細胞に対して、MBFh2 を添加し、MTT アッセイにより細胞増殖率を評価した結果、いずれの細胞においても顕著な細胞毒性は認められなかった。

MBFh2 は細胞透過性を有しており、MBFh2 を HeLa 細胞あるいは A431 細胞に添加後、外部から過酸化水素の添加に対し、細胞内に赤色蛍光の増大が観測された。また、上皮成長因子の添加によっても、A431 細胞内に赤色蛍光の増大を観測することができた (図 2)、さらに、蛍光増大過程をリアルタイムで観測することにも成功した (Chem. Commun. 2013)。

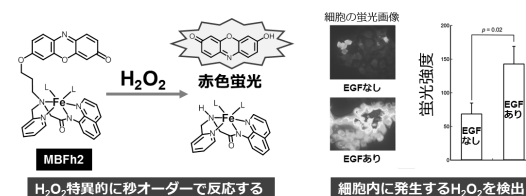


図 2 MBh2 を用いた過酸化水素蛍光検出

過酸化水素との反応により緑色蛍光物質フルオレセインを生成する MBFh3 を開発した。MBFh3 は「C-O 結合の酸化的切断」と「生成する還元型フルオレセインの酸化」という二つの酸化反応によって、緑色蛍光物質を生成する (Bull. Chem. Soc. Jpn. 2014)。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 11 件)

岩本 勇次、小寺 政人、人見 穰、Uncaging a Catalytic Hydrogen Peroxide Generator through the Photo-Induced Release of Nitric Oxide from a {MnNO}<sup>6</sup> Complex、Chemical Communications、51 巻、2015、9539-9542、査読有

DOI: 10.1039/C5CC02566D

人見 穰、岩本 勇次、小寺 政人、Mononuclear Nonheme Iron(III) Complexes that Show Superoxide Dismutase-like Activity and Antioxidant Effects against Menadione-Mediated Oxidative Stress、Chemical Communications、51、2015、8702-8704、査読有

DOI: 10.1039/C5CC02019K

人見 穰、青木 一樹、宮地 亮昌、大山 順也、小寺 政人、田中 庸裕、杉原文徳、Gold Nanoparticles Coated with Manganese-Porphyrin that Effectively Shorten the Longitudinal Relaxation Time of Water Molecules Depending on the Particle Size、Chemistry Letters、12 巻、2014、1901-1903、査読有

DOI: 10.1246/cl.140812

人見 穰、荒川 健吾、小寺 政人、Synthesis, Stability and Reactivity of the First Mononuclear Nonheme Oxoiron(IV) Species with Monoamido Ligation: A Putative Reactive Species Generated from Iron-Bleomycin、Chemical Communications、50 巻、2014、7485-7487、査読有

DOI: 10.1039/C4CC01409J

人見 穰、武安 俊幸、小寺 政人、Development of Green-Emitting Iron Complex-Based Fluorescent Probes for Intracellular Hydrogen Peroxide Imaging、Bulletin of the Chemical Society of Japan、87 巻 7 号、2014、819-824、査読有

DOI: 10.1246/bcsj.20140055

人見 穰、江川 朋志、小寺 政人、Water Proton Relaxivity, Superoxide Dismutase-like Activity, and Cytotoxicity of a Manganese(III) Porphyrin Having Four Poly(ethylene glycol) Tails、Chemistry Letters、43 巻 5 号、2014、721-734、査読有

DOI: 10.1246/cl.140029

人見 穰、岩本 勇次、小寺 政人、Electronic Tuning of Nitric Oxide Release from Manganese Nitrosyl Complexes by

Visible Light Irradiation: Enhancement of Nitric Oxide Release Efficiency by Nitro-Substituted Quinoline Ligand、Dalton Transactions、43 巻、2014、2161-2167、査読有

DOI: 10.1039/C3DT51719E

人見 穰、野村 章子、宮地 亮昌、武安 俊幸、小寺 政人、Peptide Conjugates of Organoselenium Compounds with Glutathione Peroxidase-Like Activity、Peptide Science、2013、199-202、査読有

人見 穰、武安 俊幸、小寺 政人、Iron Complex-Based Fluorescent Probes for Intracellular Hydrogen Peroxide Detection、Chemical Communications、49 巻、2013、9929-9931、査読有

DOI: 10.1039/C3CC44471F

人見 穰、平松 和明、荒川 健吾、武安 俊幸、畑 征志、小寺 政人、An Iron(III) Tetradentate Monoamido Complex as a Nonheme Iron-Based Peroxidase Mimetic、Dalton Transactions、42 巻 36 号、2013、12878-12882、査読有

DOI: 10.1039/C3DT51483H

人見 穰、荒川 健吾、小寺 政人、Electronic Tuning of Iron-Oxo Mediated C-H Activation: Effect of Electron Donating Ligand on Selectivity、Chemistry - A European Journal、19 巻 43 号、2013、14697-14701、査読有

DOI: 10.1002/chem.201302111

### [学会発表](計 5 件)

人見 穰、Selective Oxidation by Mononuclear Oxoiron Complexes with Monoamido Ligation、錯体化学会第 64 回 討論会(2014)、2014 年 9 月 18 日、東京都文京区(中央大学後楽園キャンパス)。

人見 穰、Alkane Hydroxylation by Oxoiron Species Supported by Pentadentate N5 Ligands with Monoamido Coordination、4 International Conference on Hydrogen Atom Transfer (iCHAT 2014)、2014 年 6 月 25 日、Italy。

人見 穰、Metal Complex-Based Fluorescent Probes for Imaging Hydrogen Peroxide、41st International Conference on Coordination Chemistry (ICCC)、2014 年 7 月 24 日、Singapore。

人見 穰、Development of Metal Complexes Working in Cells: Fluorescent Probes for Intracellular Hydrogen Peroxide、錯体化学会第 63 回 討論会、2013 年 11 月 2 日、琉球大学千原キャンパス。

人見 穰、使える分子活性化触媒の開発: 生体金属酵素モデル研究からのアプローチ、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 25 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス。

〔産業財産権〕

出願状況（計2件）

名称：複素環化合物，金属錯体および蛍光プロ  
ローブ

発明者：人見 穰、武安俊幸

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2012-186647 号

出願年月日：24年8月27日

国内外の別：国内

名称：複素環化合物，金属錯体および蛍光プロ  
ローブ

発明者：人見 穰、武安俊幸

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2013/070479

出願年月日：25年7月29日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.strikingly.com/yutakahitomi>

6. 研究組織

(1)研究代表者

人見 穰 (HITOMI, Yutaka)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：20335186